

# DESPOBLACIÓN DE COLMENAS

## Proyecto FPTA-258 Despoblación de colmenas: determinación de sus causas en Uruguay

**Directora del Proyecto: Karina Antúnez**

**Equipo de trabajo:** Karina Antúnez<sup>1\*</sup>, Matilde Anido<sup>1</sup>, María Belén Branchiccela<sup>1</sup>,  
Jorge Harriet<sup>2</sup>, Juan Campá<sup>2</sup>, Ciro Invernizzi<sup>3</sup>, Raquel Martin-Hernández<sup>4</sup>,  
Mariano Higes<sup>4</sup>, Pablo Zunino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.  
Correo electrónico: kantunez03@gmail.com

<sup>2</sup>Apicultura, DILAVE, MGAP.

<sup>3</sup>Sección Etología, Facultad de Ciencias.

<sup>4</sup>Centro Agrario de Marchamalo, Junta de Comunidades Castilla La Mancha, Guadalajara, España.

**Título:** DESPOBLACIÓN DE COLMENAS

**Directora de Proyecto:** Karina Antúnez

**Equipo de trabajo:** Karina Antúnez, Matilde Anido, María Belén Branchiccela, Jorge Harriet, Juan Campá, Ciro Invernizzi, Raquel Martin-Hernández, Mariano Higes, Pablo Zunino

**Serie:** FPTA N° 41

© 2013, INIA

Fotografía de portada: Diego Venturini.

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia del Tecnología del INIA

Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay  
<http://www.inia.org.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

## Integración de la Junta Directiva

**Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente**

**D.M.T.V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente**



**D.M.V. Álvaro Bentancur**

**D.M.V., MSc. Pablo Zerbino**



**Ing. Agr. Joaquín Mangado**

**Ing. Agr. Pablo Gorriti**





## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 40/00 del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.

b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.

c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.



## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	9
Despoblación de colmenas.....	9
Virus .....	10
<i>Varroa destructor</i> y <i>Acarapis woodi</i> .....	10
<i>Nosema apis</i> y <i>Nosema ceranae</i> .....	11
Intoxicación con plaguicidas .....	11
Deficiencia nutricional .....	12
Situación de la apicultura en Uruguay .....	12
MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
Apiarios .....	13
Visitas a los apiarios y recolección de muestras .....	14
Registros realizados en las colmenas .....	15
Información climatológica .....	15
Análisis estadístico.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	16
Características climáticas de los años 2009 y 2010, y su incidencia en la producción apícola del país .....	16
Seguimiento de las colmenas .....	16
Pérdida de colmenas .....	19
Prevalencia de los diferentes patógenos .....	20
Detección y cuantificación de diferentes virus en abejas nodrizas .....	20
Detección y cuantificación de <i>V. destructor</i> .....	22
Detección de <i>A. woodi</i> en abejas pecoreadoras.....	24
Detección de <i>P. larvae</i> en miel .....	24
Detección de <i>Nosema</i> spp. ....	24
Origen botánico del polen .....	26
Determinación de plaguicidas en muestras de abejas.....	27
Condiciones climáticas .....	27
Determinación de la cantidad de proteína corporal de las abejas.....	27
Análisis de las causas de pérdida de las colmenas .....	30
CONCLUSIONES .....	31
BIBLIOGRAFÍA .....	32



Karina Antúnez,  
Matilde Anido,  
María Belén Branchiccela,  
Jorge Harriet,  
Juan Campá,  
Ciro Invernizzi,  
Raquel Martin-Hernández,  
Mariano Higes,  
Pablo Zunino

---

# Despoblación de colmenas

Proyecto FPTA 258

Período de Ejecución: Feb. 2009-Oct. 2011

## INTRODUCCIÓN

### Despoblación de colmenas

La actividad apícola ha adquirido gran relevancia en el sector agro-exportador de Uruguay, exhibiendo un crecimiento constante en las últimas décadas. Además de jugar un rol importante en la agricultura y la economía en nuestro país, las abejas melíferas representan un beneficio enormemente valioso asociado a la polinización. La polinización favorece la fecundación y fructificación de diferentes especies vegetales, por lo que contribuye directamente con la conservación de especies amenazadas, con la diversidad biológica y con la producción agrícola (Morse y Calderone, 2000; Simó, 2002).

Durante los últimos años, han estado ocurriendo graves episodios de despoblación de colmenas alrededor del mundo, especialmente en países del hemisferio norte, incluyendo Estados Unidos y varios países de Europa (Stokstad, 2007; Ellis *et al.*, 2010; Neumann y Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010). Estas pérdidas de colmenas no sólo afectan la producción apícola, sino que han afectado significativamente la producción agrícola que depende de la polinización (Stokstad, 2007). Científicos y apicultores alrededor del mundo están trabajando con el fin de elucidar las causas de este fenómeno. Sin embargo, hasta el momento no se ha llegado a un consenso.

En Estados Unidos, se llamó a este síndrome «*Colony Collapse Disorder* (CCD)» o Desorden del colapso de col-

menas, y se definió como la progresiva pérdida de abejas de las colonias que no son capaces de desarrollarse normalmente y que acaban muriendo sin síntomas asociables a alguna patología en particular. Los síntomas típicos incluyen desaparición de las abejas adultas (no se encuentran abejas muertas en los alrededores), y abandono de cría y reservas de miel y polen. Se ha asociado esta despoblación a la presencia de diferentes virus, especialmente el Virus de la Parálisis Aguda Israelí (Cox-Foster *et al.*, 2007), aunque su rol no está del todo claro. Otros autores sostienen que no es un solo patógeno el causante de este síndrome, sino que se debe a la interacción entre diferentes patógenos con otros factores de estrés (van Engelsdorp *et al.*, 2009; Dainat *et al.*, 2012). Las pérdidas causadas por el CCD son rápidas y ocurren en gran número (van Engelsdorp *et al.*, 2008; van Engelsdorp *et al.*, 2010a). Sin embargo, se debe tener en cuenta que esto es solo una de las explicaciones a las pérdidas de colmenas (van Engelsdorp *et al.*, 2010a).

En España, donde también se han registrado importantes fenómenos de despoblación de colmenas, se las han atribuido a la presencia del microsporidio *Nosema ceranae* (Higes *et al.*, 2006; Higes *et al.*, 2007; Martin-Hernández *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008).

Por otro lado no se debe descartar el posible papel que tenga el ácaro *Varroa destructor*, principal patógeno que afecta a las abejas melíferas alrededor del mundo (Dainat *et al.*, 2012), los agrotóxicos (Alaux *et al.*, 2010a;

van Engelsdorp *et al.*, 2010b; Vidau *et al.*, 2011) y los problemas derivados de la mala nutrición (Alaux *et al.*, 2010b; Alaux *et al.*, 2011).

En general, se ha visto que las colmenas que sufren despoblación, se encuentran afectadas por diversos patógenos (Dainat *et al.*, 2012), por lo que es difícil identificar un único factor responsable. Probablemente se deba a la co-existencia de múltiples patógenos de las abejas y de la cría, a la emergencia de patógenos más virulentos, sumado a una contaminación química con pesticidas o agrotóxicos. Estos factores debilitan las colonias facilitando la infección por otros patógenos.

### **Virus**

Una de las posibles causas de la despoblación de colmenas es la presencia de diferentes virus ARN. Se han descrito y caracterizado más de dieciocho virus que afectan a las abejas, entre ellos el virus de la parálisis crónica (CBPV), el virus de la parálisis aguda (ABPV), el virus de la celda negra (BQCV), el virus de la cría ensacada (SBV), el virus de las alas deformadas (DWV), el Kashmir virus (KV) y el virus de la parálisis Israeli (IAPV) (Chen and Siede, 2007; Maori *et al.*, 2009; de Miranda *et al.*, 2010; Genersch y Aubert, 2010).

Solamente el CBPV, SBV y DWV producen síntomas clínicos que podrían ser identificados por los apicultores. CBPV causa una enfermedad caracterizada por temblores, desorientación y en ocasiones presencia de abejas negras, de apariencia gomosa, que vuelan desorientadas alrededor de la entrada de la colmena. Las larvas afectadas con SBV no pueden dar lugar a pupas y el fluido se acumula debajo de su piel formando un saco característico y las abejas infectadas con DWV poseen menor desarrollo en su abdomen y presentan alas deformadas o carecen de ellas. Sin embargo, todos estos virus pueden persistir en estado latente en colmenas aparentemente sanas (Chen y Siede, 2007; Genersch y Aubert, 2010).

En trabajos previos realizados en el Departamento de Microbiología del IIB-CE se detectó la presencia de CBPV, ABPV, BQCV, SBV y DWV mediante RT-PCR en abejas de diferentes regiones geográficas del Uruguay. La detección de los diferentes virus en abejas de diversos departamentos, la co-infección simultánea de colonias con diferentes virus y el hecho de que el 96 % de las muestras estaban afectadas por uno o más virus, sugiere que los virus ARN están ampliamente distribuidos en Uruguay (Antunez *et al.*, 2005; Antunez *et al.*, 2006). Posteriormente, los virus ABPV, BQCV y DWV también fueron detectados en Argentina, Brasil y Chile, sugiriendo que podrían estar ampliamente distribuidos en Sudamérica (Teixeira *et al.*, 2008; Reynaldi *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2012).

### ***Varroa destructor* y *Acarapis woodi***

*Varroa destructor* es un ácaro parásito de las abejas adultas y de la cría, que causa la varroosis. Esta enfermedad tiene distribución mundial y es letal si no es tratada adecuadamente. El parásito se inserta en el abdomen, para alimentarse de la hemolinfa, debilitando a la abeja y haciéndola susceptible a otros agentes patógenos. El número de parásitos aumenta lentamente durante la temporada activa pero su pico llega al final de la temporada, cuando se reconocen los síntomas clínicos (OIE, 2008).

*Acarapis woodi* es un ácaro que afecta las abejas adultas de *A. mellifera* y otras especies. Es un parásito interno del sistema respiratorio, entran, viven y se reproducen en las tráqueas de las abejas, alimentándose de la hemolinfa del hospedero. El efecto patogénico en abejas individuales depende del número de parásitos y se atribuyen daños mecánicos y desórdenes fisiológicos provocados por la obstrucción de los conductos de aire. En algunos casos la tasa de mortandad puede llegar a ser alta. Los síntomas presentados son similares a los causados por otras enfermedades, las abejas dan vueltas alrededor de la piquera y quedan sobre el pasto, incapaces de volar (OIE, 2008).

En 1994, Shimanuki y Knox (1997) describieron el «*Parasitic Mite Syndrome*», un síndrome devastador que ocasionó una alta mortandad de abejas en Estados Unidos. Según estos autores, este fenómeno era causado por la presencia de uno o ambos ácaros *A. woodi* y *V. destructor*, simultáneamente con el virus ABPV. Síntomas similares fueron reportados en apiarios de Hungría, en colonias afectadas por estos mismos patógenos (Bekesi *et al.*, 1999). El síndrome fue posteriormente reportado en Tailandia, pero en este caso se comprobó la presencia de siete virus diferentes en conjunto con *V. destructor* (Chantawannakul *et al.*, 2006).

El ácaro *V. destructor* no sólo representa un problema en sí mismo, sino que se ha propuesto que suprime la respuesta inmune de las abejas, llevando a una activación de la replicación de los virus latentes en las mismas (Shen *et al.*, 2005a; Shen *et al.*, 2005b; Yang y Cox-Foster, 2007; Genersch y Aubert, 2010). Este patógeno, no sólo puede actuar como transmisor de diferentes virus simultáneamente y activador de su replicación en abejas, sino que puede servir además como hospedero para la replicación (Shen *et al.*, 2005a; Yue y Genersch, 2005; Genersch y Aubert, 2010).

En Uruguay, *V. destructor* es considerado el principal problema sanitario y los apicultores deben aplicar sistemáticamente acaricidas al finalizar la temporada apícola para evitar la muerte de las colonias (Invernizzi *et al.*, 2011).

En cuanto a *A. woodi*, la última muestra positiva para este ácaro en el país data de 2001 (J. Harriet, DILAVE, comunicación personal). Dada la baja incidencia de este patógeno en el país, este análisis se retiró de la rutina de diagnóstico del DILAVE, salvo en casos de sospecha. Recientemente se llevó cabo una búsqueda de *A. woodi* en las zonas del país donde históricamente se encontraba este parásito y no se halló ninguna muestra positiva (Villalba, 2012).

## ***Nosema apis* y *Nosema ceranae***

En España, los casos de despoblación han sido asociados a la presencia de *Nosema ceranae* (Higes *et al.*, 2006; Higes *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007).

*N. ceranae* es un microsporidio parásito que se creía exclusivo de las abejas asiáticas *A. cerana*, mientras que *N. apis* afectaba a la especie *A. mellifera*. Sin embargo, en 2006 Higes y colaboradores detectaron por primera vez *N. ceranae* en las abejas *A. mellifera*, y propuso que este salto de hospedero podría estar implicado en la despoblación. Posteriormente se comprobó que esta especie estaba ampliamente distribuida en todo el mundo (Martín-Hernández *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Aurori *et al.*, 2011).

En Uruguay se detectó la presencia de *N. ceranae* en muestras de abejas colectadas en diferentes departamentos del país (Invernizzi *et al.*, 2009). Incluso, fue detectada en una muestra de abejas almacenada desde antes del año 1990, constituyendo la muestra más antigua de *A. mellifera* en donde se detecta a *N. ceranae*. Este hallazgo indicaría que el salto de especie no se generó durante los últimos años, sino que fue hace al menos dos décadas. Otro dato interesante, es que en las muestras uruguayas analizadas no se logró detectar a *N. apis*, sugiriendo la posibilidad de que en nuestro país sólo estaría presente *N. ceranae*.

## **Intoxicación con plaguicidas**

Se ha propuesto que las elevadas tasas de mortandad se podrían deber a la intoxicación de las abejas con insecticidas sistémicos utilizados en agricultura. Estos insecticidas pueden tener efectos en las funciones cognitivas, incluyendo aprendizaje, memoria, olfato, gusto, navegación y orientación; efecto en el comportamiento y efectos fisiológicos (Belzunces *et al.*, 2012). Entre los insecticidas más utilizados en Uruguay, se encuentra el fipronil.

Éste es altamente tóxico en abejas (LD50 = 0,004 µg/abeja) y ha sido asociado también a grandes pérdidas por despoblación (Tingle *et al.*, 2003; Moreira y Cancino, 2005). Aún en dosis subletales, este compuesto puede causar trastornos en los procesos relacionados con memoria olfativa y visual (El Hassani *et al.*, 2005; El Hassani *et al.*, 2008).

La administración de fipronil a abejas infectadas con *N. ceranae* aumenta significativamente la mortalidad (Vidau *et al.*, 2011). Resultados similares se obtuvieron con el pesticida imidacloprod (Alaux *et al.*, 2010a). Es importante notar que tanto imidacloprod como fipronil han sido detectados previamente en nuestro país, y se los ha asociado con casos puntuales de mortalidad de abejas (Pareja *et al.*, 2011). Actualmente (desde julio de 2009) el uso de fipronil en aplicación foliar se encuentra prohibido por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

### **Deficiencia nutricional**

Otro factor que se encuentra en estudio es la deficiencia nutricional, en particular la disminución del aporte proteico. Las tendencias agro-económicas actuales, en particular el avance de la forestación así como de otros monocultivos ocasionan la pérdida de la diversidad de polen, lo que podría ejercer algún tipo de influencia sobre esta situación (Vandame y Palacio, 2010). Además, se ha visto que la nutrición también está relacionada a la inmunocompetencia individual así como social (Alaux *et al.*, 2010b).

### **Situación de la apicultura en Uruguay**

En Uruguay la actividad apícola ha venido adquiriendo cada vez mayor relevancia dentro del sector agro-exportador, con un crecimiento constante que se refleja tanto en el volumen de producción de miel así como en el ingreso de divisas fundamentalmente relacionadas con la exportación de este producto. Actualmente existen alrededor de 3000 apicultores registrados, que poseen 500.000 colmenas (DIGEGRA, 2010).

La mayor parte de la producción de miel es exportada principalmente a Alemania, España, Francia y Estados Unidos, generando en promedio U\$S 20.000.000 anuales, aunque durante el año 2012 su precio disminuyó por la detección de alcaloides pirrolizidínicos y organismos genéticamente modificados (J. Harriet, DILAVE, comunicación personal; Santos, 2010).

En los últimos años la actividad apícola en nuestro país ha enfrentado grandes problemas. Por un lado, los cambios profundos del ambiente derivados de la transformación de la estructura productiva agropecuaria. Entre estos cambios se encuentran el crecimiento de la superficie dedicada a la agricultura, lo que genera pérdida de diversidad floral, disminuyendo la oferta de recursos nectaríferos y poliníferos disponibles para las abejas, así como el aumento en la utilización de herbicidas e insecticidas (Mendoza, 2012). Por otro lado, algunos temas sanitarios preocupan a los apicultores, como la incidencia de *N. ceranae* en plantaciones de *Eucalyptus grandis*, la presencia de haplotipos de *V. destructor* resistentes a los acaricidas, y la presencia y distribución de diferentes virus (Invernizzi *et al.*, 2011).

En nuestro país, hasta el momento no se han registrado episodios masivos de despoblación de colmenas tales como los descritos en Europa o Estados Unidos (Neumann y Carreck, 2010), aunque si se ha observado un aumento significativo en la despoblación invernal de las colmenas. Vandame y Palacio (2010) llegaron a una conclusión similar al analizar la situación de diferentes países de Latinoamérica. Sin embargo, los principales patógenos apícolas, potenciales responsables de los episodios masivos de despoblación de colmenas, se encuentran presentes y ampliamente distribuidos.

Dada la gravedad y la repercusión económica y social de los episodios de despoblación de colmenas que están ocurriendo en diferentes países y el rol que los patógenos desempeñan en los mismos, consideramos que es esencial ampliar la información existente sobre la presencia e interacción de los diferentes patógenos en colmenas de nues-

tro país, y evaluar su posible influencia en la pérdida de colmenas en Uruguay. Esto podría ayudar a comprender, prevenir y enfrentar este problema.

El objetivo de este estudio fue evaluar la contribución de diferentes factores (patógenos, desnutrición, insecticidas, clima) en las pérdidas de colmenas que se producen en Uruguay.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Apiarios

Se seleccionaron dos apiarios para ser analizados durante el transcurso del presente proyecto. El Apiario 1, Barker II, está localizado en Barker, Colonia (S 34° 14'38.1"; WO 57° 26'55.6") mientras que el Apiario 2, San Ramón Ciprés, está localizado en Canelones (S 34° 18'38.0"; WO 55° 52'02.4"). En las figuras 1 y 2 se muestran los apiarios.



**Figura 1.** Apiario 1, Barker II, localizado en Colonia.



**Figura 2.** Apiario 2, San Ramón Ciprés, localizado en Canelones.

## 14 Despoblación de colmenas

Para la selección de los apiarios se tomaron en cuenta una serie de criterios:

- presencia de mortalidad de colonias mayor a la habitual,
- descarte de causas conocidas de despoblación (ej. causas asociadas al manejo del apiario, no aplicación de tratamientos contra *V. destructor*, etc),
- pertenencia a una empresa agrícola con antecedentes avalados acerca de su producción y manejo, inscrita en el Registro Nacional de Colmenas de la Dirección General de la Granja (DIGEGRA),
- no administración de aporte vitamínico y/o proteico,
- el manejo de las colmenas debería reducirse al mínimo durante el desarrollo de este estudio, siendo el

tratamiento contra *V. destructor* incluido en las «Pautas sugeridas de manejo de la varroasis» (DILAVE) el único permitido.

Dado que ambos apiarios se encuentran ubicados en las zonas de mayor producción apícola del país, su situación es representativa de nuestra realidad apícola.

### Visitas a los apiarios y recolección de muestras

Se realizaron muestreos en marzo, junio, setiembre y diciembre de los años 2009 y 2010. En cada salida al campo se recorrió cada apiario y se tomaron muestras de abejas de todas las colmenas (30 colmenas) (figura 3). Posteriormente se seleccionaron al azar 20 de las 30 colmenas por apiario, para analizar.



Figura 3. A, B y C. Acondicionamiento y preparación de los recipientes para la toma de diferentes muestras.

Cada muestra consistió en:

- abejas nodrizas: tomadas de al menos tres puntos diferentes de la colmena
- abejas pecoreadoras: originalmente se pensó en tomar abejas pecoreadoras, que realizan actividades afuera de la colmena, pero ya que en otoño-invierno es muy difícil obtener este tipo de abejas, se decidió coleccionar abejas de interior pero alejadas del área de cría. Igualmente para distinguirlas de las abejas nodrizas se mantuvo la denominación de abejas pecoreadoras
- una muestra de pan de polen
- una muestra de miel cercana a la cría

Las abejas nodrizas y pecoreadoras se colocaron por separado en recipientes plásticos con alcohol para evitar su descomposición y permitir su almacenamiento hasta el momento del análisis. Una parte de las abejas nodrizas (30 abejas) se colocó en sobres de manila y estas abejas se mantuvieron vivas hasta llegar al laboratorio donde se almacenaron a -80 °C, para evitar la degradación del ARN viral.

### Registros realizados en las colmenas

En el apiario, se estimaron los siguientes parámetros:

- población de abejas adultas (caras de cuadros cubiertos con abejas)
- cantidad de cría (octavos de cuadros con cría)
- cantidad de reservas (octavos de cuadros con reservas)
- presencia de síntomas

En el laboratorio, se realizaron los siguientes análisis:

- Detección y cuantificación de diferentes virus en abejas nodrizas, mediante la técnica de PCR en tiempo real (desarrollada en el presente proyecto, en el Departamento de Microbiología del IIBCE).
- Detección y cuantificación del ácaro *V. destructor* en abejas nodrizas y pecoreadoras, mediante obser-

vación en la lupa (realizado en el DILAVE, MGAP)(OIE, 2004b)

- Detección de *A. woodi* en abejas nodrizas y pecoreadoras mediante PCR (realizado en el Centro Agrario de Marchamalo, España).
- Detección y cuantificación de esporas de *Paenibacillus larvae* en miel mediante cultivo y confirmación mediante PCR (realizado en Departamento de Microbiología, IIBCE) (Piccini *et al.*, 2001; Antúnez *et al.*, 2004).
- Cuantificación de esporas de *Nosema* spp. en abejas nodrizas y pecoreadoras mediante conteo en microscopio (realizado en el DILAVE, MGAP) (OIE, 2004a).
- Detección de la especie de *Nosema* spp. mediante PCR (realizado en el Centro Agrario de Marchamalo, España) (Martin-Hernández *et al.*, 2007).
- Determinación del origen botánico del polen (realizado en Facultad de Ciencias, UdelaR) (Erdtman, 1952; Gambero and Cárdenas, 1980).
- Detección y cuantificación de plaguicidas en polen (realizado en Sección Química, DILAVE, MGAP).
- Determinación del porcentaje de proteína corporal de las abejas nodrizas, mediante la determinación de nitrógeno total por la técnica de Kjeldhal (realizado en Facultad de Agronomía, UdelaR).

### Información climatológica

Se obtuvo información acerca de temperatura, presión, horas de sol, humedad y precipitaciones mensuales. Dicha información fue recabada por el Dirección General de Meteorología, en las estaciones meteorológicas más cercanas a los apiarios (Carrasco y Colonia).

### Análisis estadístico

En base al seguimiento realizado se estimó el porcentaje de pérdida de colmenas por año y por apiario, y en cada

caso se determinó la causa de dicha pérdida.

Por otro lado, con los resultados obtenidos para cada patógeno se obtuvo información acerca de su prevalencia en cada estación del año, obteniendo así información sobre su estacionalidad. Para esto se empleó el test de Kruskal Wallis. Luego se compararon los niveles de infección obtenidos en las diferentes estaciones del año 2009 con las mismas estaciones del año 2010, mediante el test de Mann Whitney.

Posteriormente se estudiaron las correlaciones entre los diferentes parámetros analizados, separando los resultados por año y por apiario. Se empleó el test de Spearman para las variables cuantitativas, Chi-cuadrado para variables cualitativas y Mann Whitney para relacionar variables cualitativas con cuantitativas.

Por último, para evaluar el papel de los diferentes factores en la despoblación de colmenas se repitieron los análisis de correlaciones, pero en este caso se tomó cada estación de forma independiente y se excluyeron las colmenas que se despoblaron por razones identificadas (intento de recambio de reina, hambre, etc.).

Para facilitar la visualización de los resultados, sólo se presentan las correlaciones o asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características climáticas de los años 2009 y 2010, y su incidencia en la producción apícola del país

Antes de presentar los resultados obtenidos en el presente trabajo es importante analizar el marco productivo y climático del país durante estos años, ya que fueron dos años con condiciones climáticas diferentes que incidieron significativamente en la producción apícola. En el año 2009 se registró una sequía muy prolongada que afectó a gran parte del país. Durante este año se evidenció una disminución abrupta de la productividad de

miel por colmena (promedio del país en 2007: 30,2 kg/colmena; 2008: 24,4 kg/colmena; 2009: 14,1 kg/colmena; 2010: 18,5 kg/colmena) lo que incidió significativamente en la producción global de miel y en las exportaciones (Harriet y Campá, 2012).

Estas condiciones climáticas desfavorables para la apicultura tuvieron impactos diferentes según la zona geográfica del país, probablemente debido a las floraciones predominantes de cada zona.

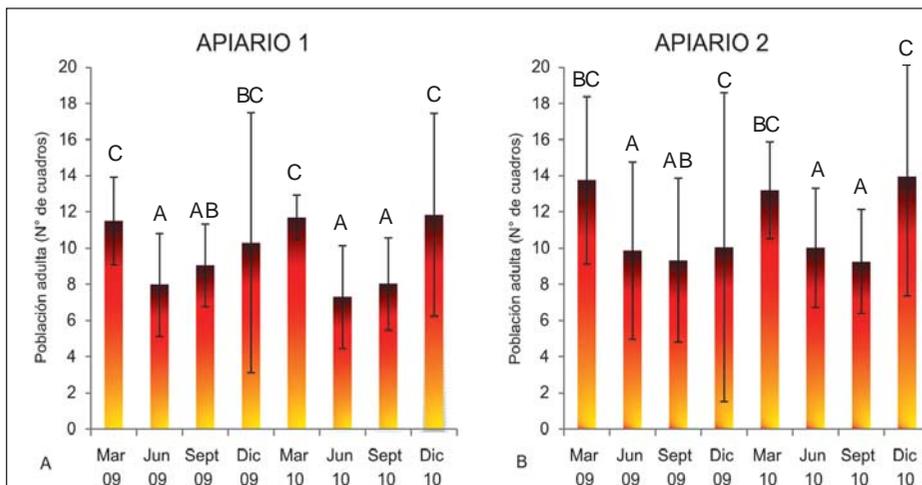
En el departamento de Colonia, donde se encontraba el apiario 1, las condiciones climáticas incidieron fuertemente en la producción a partir del año 2008 (promedio en 2007: 42,7 kg/colmena; 2008: 14,1 kg/colmena; 2009: 11,3 kg/colmena; 2010: 12,6 kg/colmena). Al comparar 2009 con 2010 se observa que la productividad fue muy similar.

Por otro lado, en el departamento de Canelones, donde se encuentra el apiario 2, la productividad por colmena también se vio afectada pero en este caso el descenso en la producción fue en el año 2009, con la sequía (promedio en 2008: 22,5 kg/colmena; 2009: 8,5 kg/colmena; 2010: 22,7 kg/colmena). En este caso la productividad del año 2009 fue muy inferior a la obtenida en el año 2010 (Harriet y Campá, 2012).

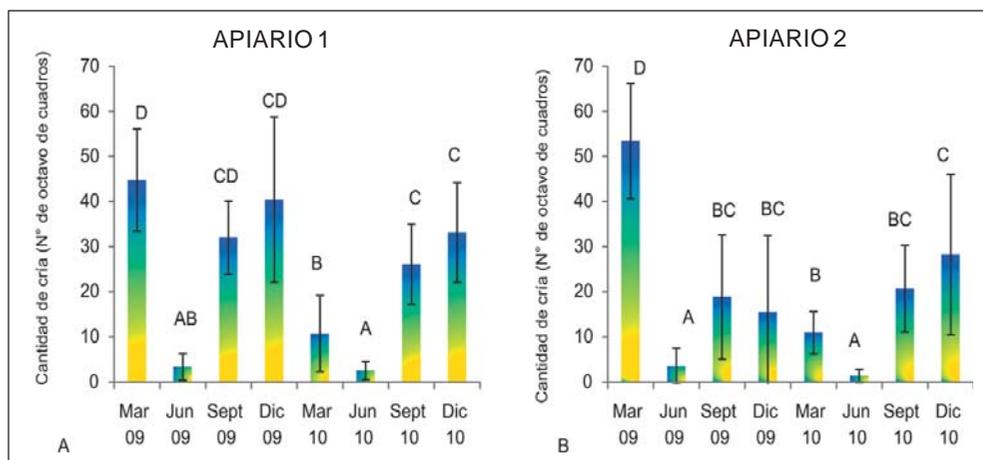
### Seguimiento de las colmenas

En primer lugar se realizó el seguimiento de las colmenas mediante el análisis de la población de abejas adultas, cantidad de cría, de reservas y presencia de síntomas. En las figuras 4, 5 y 6 se observan los resultados de los dos apiarios, durante los dos años de trabajo.

La población de abejas así como la cría disminuyeron de marzo a junio y luego aumentaron significativamente de junio - setiembre a diciembre tanto en 2009 como en 2010 (Figuras 4 y 5). Esto es esperable, ya que la colmena tiene un ciclo biológico anual acorde a las condiciones climáticas. No se encontraron diferencias significativas en la población de abejas al comparar el año 2009 con el 2010 cuando estos



**Figura 4.** Población de abejas adultas en colmenas de los Apiarios 1 y 2 durante los años 2009 y 2010. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas.



**Figura 5.** Cantidad de cría en colmenas de los apiarios 1 y 2 durante los años 2009 y 2010. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas.

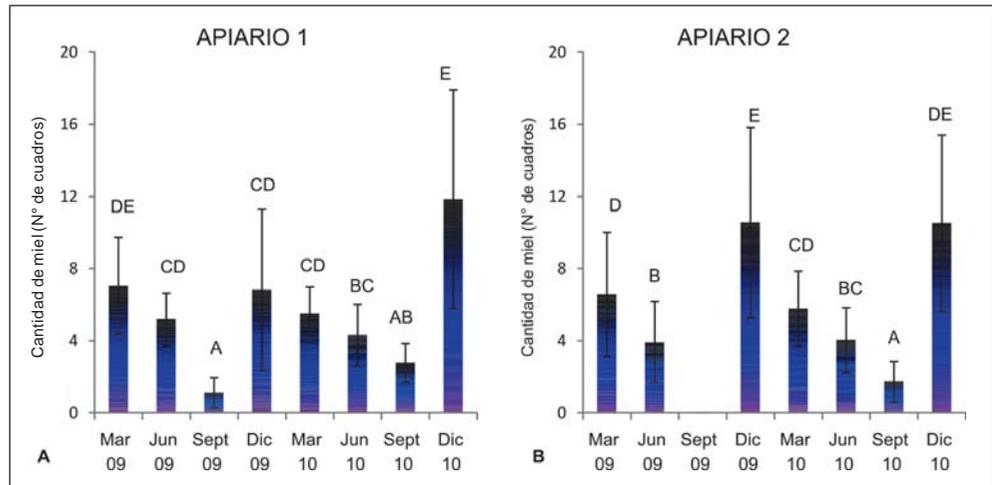
análisis se realizaron trimestre a trimestre. Al comparar la cantidad de cría, se encontró mayor cantidad en marzo de 2009 que en la misma estación de 2010.

En cuanto a la producción de miel, también siguió el mismo comportamiento, disminuyó de junio a setiembre y aumentó de setiembre a diciembre en 2009 y 2010 (Figura 6).

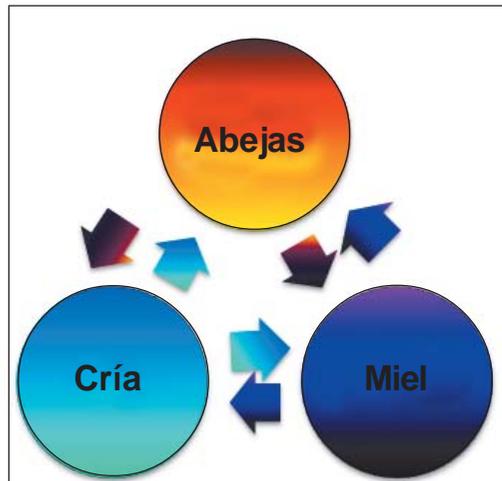
Al analizar la correlación entre estos parámetros, se encontró que población de abejas, cría y producción de miel se encontraron positiva y signifi-

cativamente asociados entre ellos, indicando que a mayor cantidad de abejas, mayor cantidad de cría y mayor producción de miel (Figura 7, Cuadro 1).

Al comparar la producción de miel durante los dos años de este trabajo, se observó una mayor producción de miel en setiembre de 2010 que en 2009, en ambos apiarios. Esto no sólo se evidenció en estos apiarios, sino que fue observado en todo el país, de acuerdo a lo expresado en el punto anterior.



**Figura 6.** Cantidad de reservas de miel en colmenas de los apiarios 1 y 2 durante los años 2009 y 2010. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas.



**Figura 7.** Relación entre la población de abejas adultas, cantidad de cría y reservas de miel.

### Pérdida de colmenas

Durante el desarrollo de este proyecto, en nuestro país no se detectaron episodios masivos de despoblación de colmenas como los reportados en países del hemisferio norte. Sin embargo, sí se detectaron pérdidas de colmenas en diferentes apiarios, en un porcentaje mayor a lo normal (mayor al 10-15 %) (Figura 8).

En el apiario 1 se muestrearon 40 colmenas al inicio del año 2009 y durante ese año murieron el 22 % de las mismas. El factor desencadenante de estas muertes en la mayoría de los casos (67 %) fue

el intento de recambio de reina (evidenciado por la presencia de colmenas zanganeras o de celdas reales). El 33 % de las colmenas murieron sin explicación aparente.

En el año 2010 se muestrearon 30 colmenas y durante ese año murieron el 20 %. Al igual que en el año 2009, el factor desencadenante de gran parte de los casos (50 %) fue el intento de recambio de reina, mientras que el 50 % de las colmenas murieron sin explicación aparente.

En el apiario 2, durante el año 2009 se muestrearon 30 colmenas de las cuales murió el 40 % de las mismas. De las colmenas que murieron, el 41 % lo hizo por intento de cambio de reina, el 41 % por factores externos (hambre, falta de néctar y polen) y el 18 % sin causa aparente.

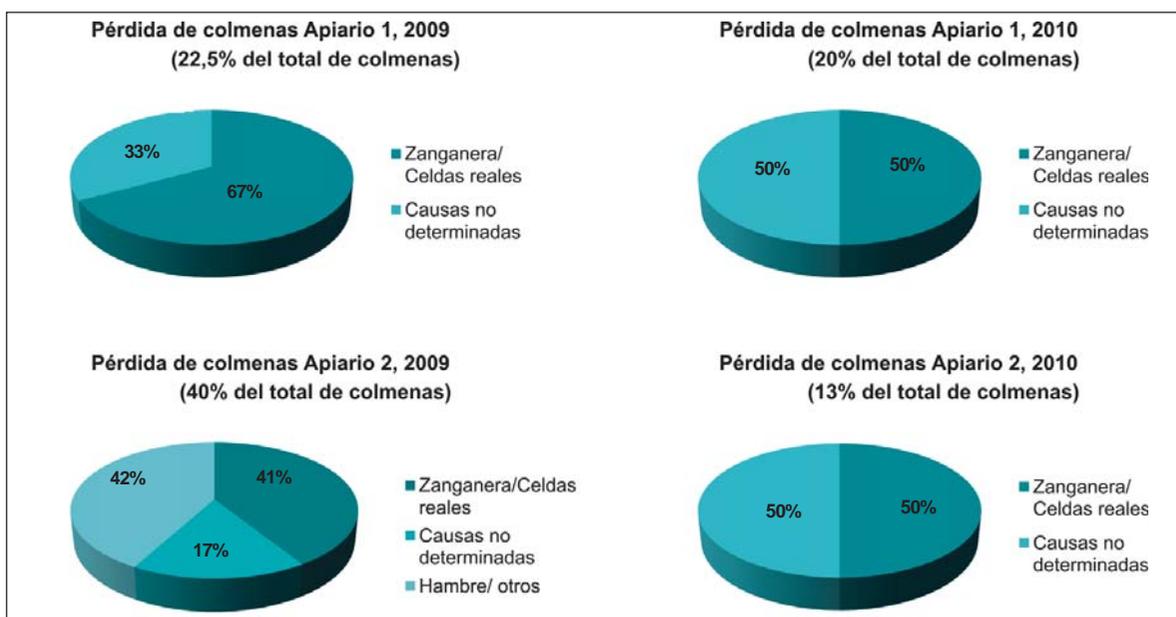
En el 2010 se muestrearon 30 colmenas y durante ese año murieron el 13 % de las mismas. Nuevamente, el intento de cambio de reina fue el causante del 50 % de las pérdidas, mientras que el otro 50 % murieron sin explicación aparente.

Al analizar en general las causas de pérdidas de colmenas, se observa que gran parte de dichas colmenas murieron por quedar zanganeras o intentar cambiar la reina (67 %) y sólo una parte muere sin causas evidentes (Figura 9).

**Cuadro 1.** Análisis de correlaciones de Spearman entre los diferentes parámetros analizados. Se tomaron los dos apiarios y los dos años de forma independiente. Para facilitar la visualización de los resultados, sólo se muestran las asociaciones estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$  en rojo y  $p \leq 0,1$  en azul).

	APIARIO 1, 2009			APIARIO 1, 2010			APIARIO 2, 2009			APIARIO 2, 2010		
	N	R	p	N	R	p	N	R	p	N	R	p
Abejas y Cría	77	0,63	0,000	78	0,44	0,000	67	0,35	0,003	78	0,32	0,004
Abejas y Miel	76	0,47	0,000	78	0,74	0,000	53	0,75	0,000	78	0,52	0,000
Cría y Miel	76	0,27	0,020	78	0,32	0,005	54	0,31	0,023	79	0,13	0,239
Abejas y <i>V. destructor</i>	75	0,30	0,008	78	0,10	0,361	67	0,30	0,012	73	0,09	0,432
Cría y <i>V. destructor</i>	75	0,42	0,000	78	0,43	0,000	69	0,72	0,000	74	0,23	0,049
Cría y SBV	73	0,49	0,000	75	0,30	0,009	68	0,32	0,007	77	0,20	0,081
Abejas y <i>N. ceranae</i>	77	-0,18	0,114	78	-0,13	0,275	67	-0,12	0,318	76	-0,37	0,001
Cría y <i>N. ceranae</i>	76	-0,29	0,010	78	-0,08	0,496	69	-0,27	0,025	77	-0,06	0,579
Miel y <i>N. ceranae</i>	75	-0,03	0,813	78	-0,10	0,393	54	0,11	0,444	77	-0,45	0,000
BQCV y DWV	73	0,03	0,825	75	0,17	0,139	68	0,41	0,001	77	-0,14	0,211
BQCV y SBV	73	0,32	0,006	75	-0,12	0,304	68	0,20	0,110	77	0,20	0,083
DWV y SBV	73	0,21	0,079	75	-0,02	0,871	68	0,49	0,000	77	-0,11	0,354
<i>V. destructor</i> y ABPV	71	0,24	0,041	75	-0,05	0,667	67	0,17	0,169	73	0,13	0,289
<i>V. destructor</i> y DWV	71	0,31	0,008	75	0,13	0,249	68	0,71	0,000	73	0,14	0,240
<i>V. destructor</i> y SBV	71	0,24	0,042	75	0,36	0,001	68	0,55	0,000	73	0,28	0,015
<i>V. destructor</i> y <i>N. ceranae</i>	75	-0,19	0,097	78	0,03	0,780	69	-0,35	0,003	73	-0,16	0,179
<i>V. destructor</i> y Cv	75	0,22	0,055	78	0,30	0,008	69	0,55	0,000	74	0,13	0,284
<i>N. ceranae</i> y DWV	72	-0,07	0,565	75	-0,11	0,356	68	-0,39	0,001	75	-0,15	0,210
<i>N. ceranae</i> y SBV	72	-0,18	0,121	75	-0,18	0,132	68	-0,35	0,003	75	-0,09	0,422
<i>N. ceranae</i> y <i>V. destructor</i>	75	-0,19	0,097	78	0,03	0,780	69	-0,35	0,003	73	-0,16	0,179
<i>N. ceranae</i> y Cv	77	-0,26	0,021	78	-0,10	0,369	69	-0,25	0,036	77	-0,28	0,013

Cv. Cantidad de virus diferentes encontrados.



**Figura 8.** Causas de pérdida de colmenas en los apiarios 1 y 2, durante los años 2009 y 2010.

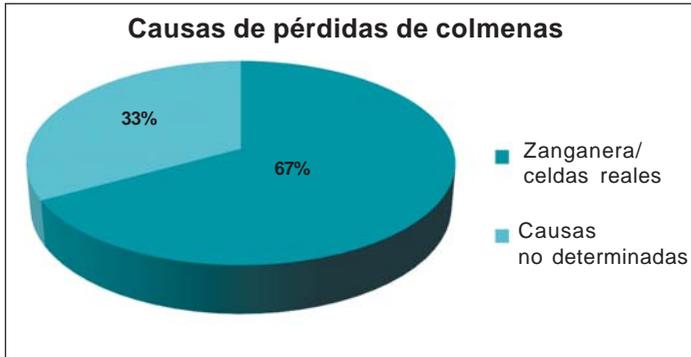


Figura 9. Resumen de las causas de pérdidas de colmenas.

### Prevalencia de los diferentes patógenos

#### Detección y cuantificación de diferentes virus en abejas nodrizas

En primer lugar se puso a punto una metodología basada en la técnica de

PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de virus en abejas. Esta técnica presenta la ventaja de permitir la cuantificación de cada virus, lo que no era posible con la técnica empleada anteriormente en nuestro laboratorio (basada en RT-PCR).

Esta técnica permitió la detección y cuantificación de los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV, mientras que no se lograron detectar los virus IAPV y KBV. Estos resultados sugieren que estos virus no están presentes en nuestro país. Los resultados se muestran en las figuras 10 y 11.

**ABPV:** el porcentaje de colmenas infectadas con ABPV (prevalencia) resultó alto en marzo, a finales del verano (cercano al 90 % en ambos apiarios), y disminuyó al avanzar el año, hacia junio o setiembre. En cuanto al nivel de infección (o carga viral), también resultó alta al inicio del proyecto y

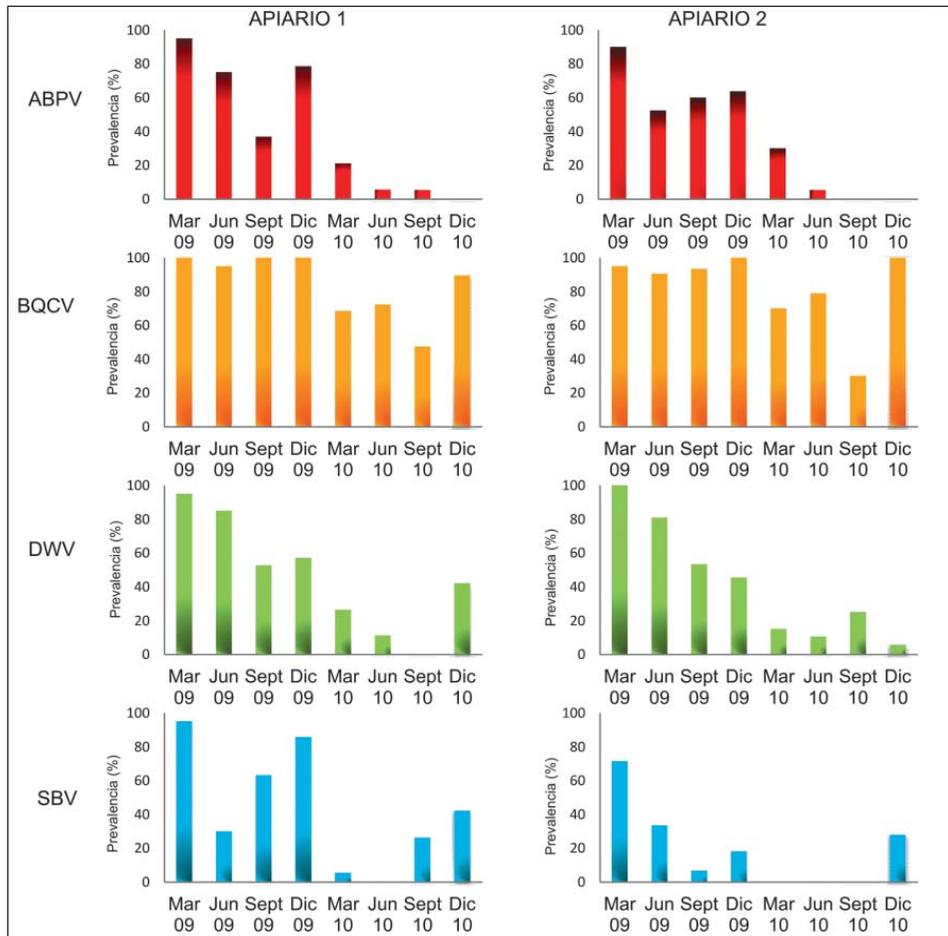
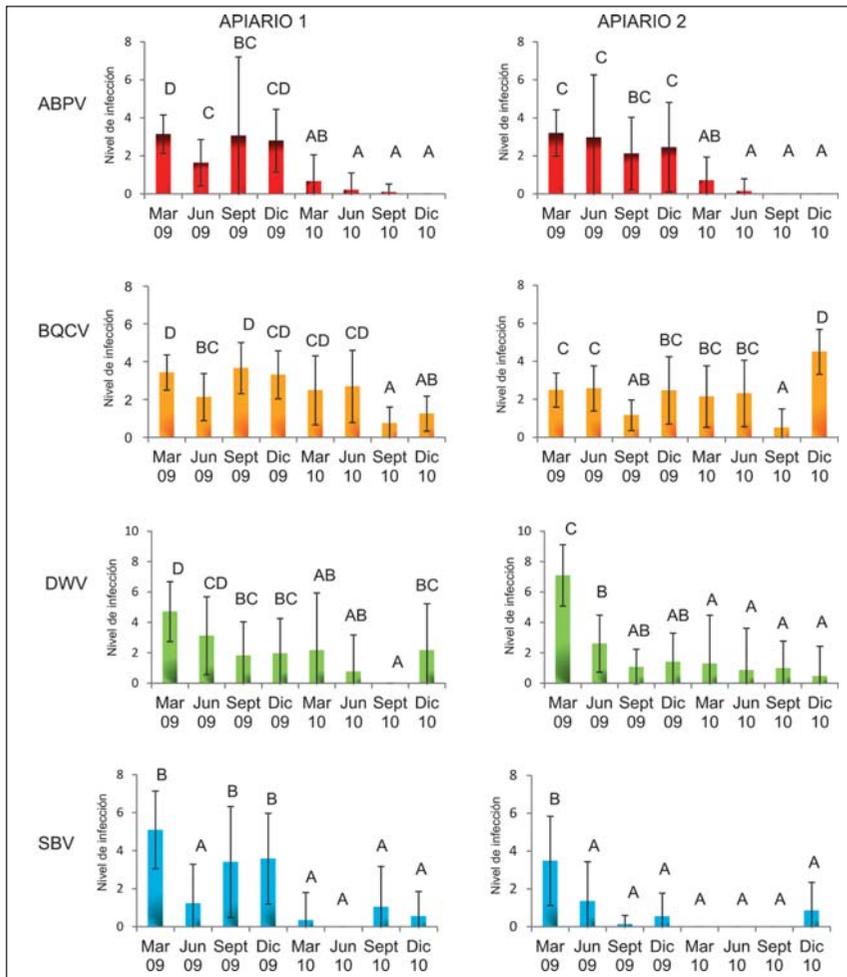


Figura 10. Prevalencia de diferentes virus en abejas en los apiarios 1 y 2 durante los años 2009 y 2010.



**Figura 11.** Nivel de infección de los diferentes virus en abejas en los apiarios 1 y 2 durante los años 2009 y 2010.

disminuyó de marzo a junio de 2009. En el apiario 2 también se observa una disminución pero dada la alta variabilidad, no resultó estadísticamente significativa. En el año 2010 hubo muy pocas muestras infectadas, por lo que no se encontraron variaciones significativas durante el año.

Al comparar los dos años de trabajo, se encontró que hubo significativamente más colmenas infectadas, y mayor nivel de infección en todas las estaciones del año de 2009 que en 2010.

**BQCV:** la prevalencia del BQCV resultó alta durante todo el año, siendo 82,5 % el promedio en ambos años y en ambos apiarios. El nivel de infección de este virus fue alto en marzo de 2009 y disminuyó en el correr del año, hacia junio o setiembre en 2009 y luego se mantuvo estable. Al comparar 2009

con 2010, se encontró una mayor prevalencia en 2009, así como mayor nivel de infección al comparar el mes de diciembre en ambos años.

**DWV:** la prevalencia en marzo de 2009 resultó alta (95 y 100 % en los apiario 1 y 2, respectivamente) pero fue disminuyendo a lo largo del tiempo. El nivel de infección también resultó alto en marzo de 2009, y disminuyó de marzo a junio en ambos apiarios durante ese año. Durante el año 2009 la prevalencia de este virus así como la carga viral fue mayor que en 2010.

**SBV:** el número de colmenas infectadas y el nivel de infección disminuyeron significativamente de otoño a invierno en 2009 y luego se mantuvo bajo. También se encontró mayor prevalencia de este virus y mayor nivel de infección en 2009 que en 2010.

Como observación general se puede asumir que se encontró una disminución significativa en la carga viral de los diferentes virus entre marzo y junio de 2009.

Al comparar la incidencia de los virus durante los dos años de trabajo, se encontró una gran diferencia entre el año 2009 (año caracterizado por la sequía, donde hubo una baja producción de miel en todo el país, lo que se reflejó en estos apiarios) y el año 2010 (año con buen nivel de precipitaciones, y con buena producción apícola en general). En el año 2009 se encontró un mayor nivel de infección y mayor prevalencia de los diferentes virus, comparado con el 2010.

Al estudiar la correlación entre los diferentes virus también se observó el efecto «año». En el 2009 se observó que la presencia y el nivel de infección de los virus BQCV, DWV, SBV estaban positivamente correlacionadas entre sí, indicando que a mayor nivel de infección de uno de esos virus, hay mayor nivel de infección por los otros (figura 12, cuadro 1). Esto se evidenció en los dos apiarios de forma independiente.

Sin embargo, en el año 2010 no se encontraron estas correlaciones, sugiriendo que las condiciones climáticas y la disponibilidad de flores y néctar estarían influyendo en la infección por virus.

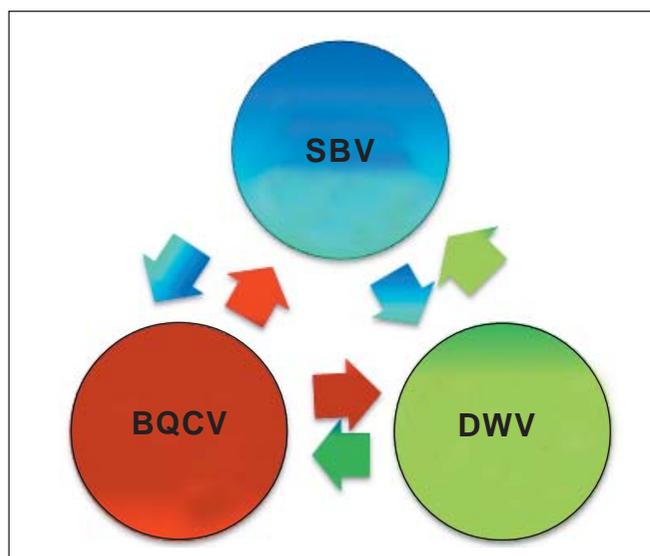


Figura 12. Relación entre el nivel de infección de los diferentes virus.

Un punto interesante, es que el nivel de infección por SBV se asoció positivamente en los dos apiarios y en los dos años, con la cantidad de cría (ver Cuadro 1).

### Detección y cuantificación *V. destructor*

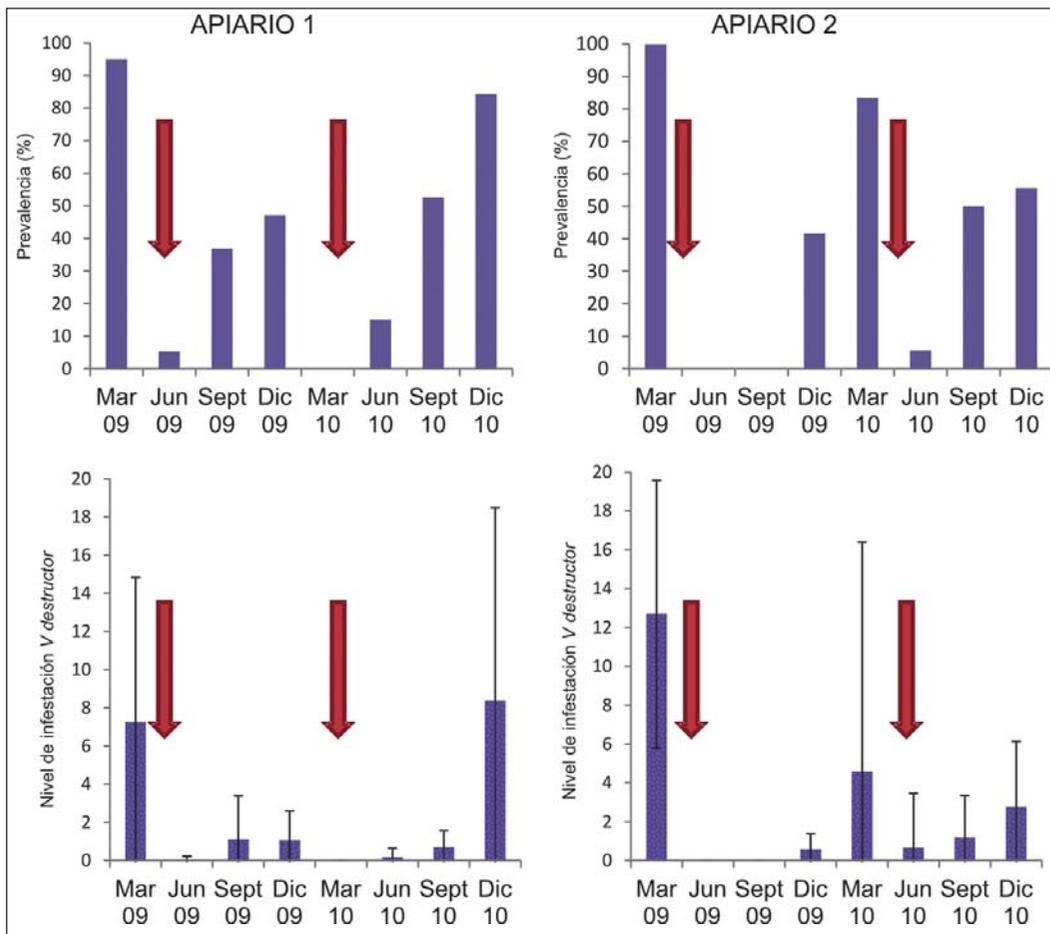
Se determinó el porcentaje de infestación de las abejas nodrizas y pecoreadoras con *V. destructor*, así como la prevalencia de este patógeno en las diferentes estaciones durante 2009 y 2010.

Los resultados encontrados al analizar abejas nodrizas y pecoreadoras fueron similares y de acuerdo al Test de Chi-cuadrado, ambos parámetros están asociados ( $\chi^2=32,34$ ;  $p<0,01$  y  $\chi^2=38,80$ ;  $p<0,01$  para Ap.1 y 2 respectivamente). Por este motivo sólo se presentan los resultados encontrados en abejas nodrizas, de acuerdo a lo recomendado por la OIE (Figura 13).

En marzo de 2009 el porcentaje de infestación por colmena así como el porcentaje de colmenas infestadas fue muy alto en ambos apiarios, y estos valores disminuyeron significativamente hacia junio. Esto se debe a que en marzo se aplicó el tratamiento para el control de este ácaro, el cual resultó efectivo. Con el correr del año el nivel de infestación así como la prevalencia comienzan a aumentar nuevamente, hasta que en marzo de 2010 se aplicó el nuevo tratamiento, y estos niveles nuevamente disminuyeron.

Se encontró una correlación positiva entre el nivel de infestación del ácaro y la población de abejas, cría y producción de miel (ver Cuadro 1). Esto se explica porque de acuerdo al ciclo biológico, de diciembre a marzo es cuando hay mayor población de abejas, cría y mayor producción de miel, y estos parámetros disminuyen hacia el otoño; por otro lado, en verano también aumenta la población de ácaros, la que disminuye drásticamente en el otoño debido a la aplicación de tratamientos acaricidas.

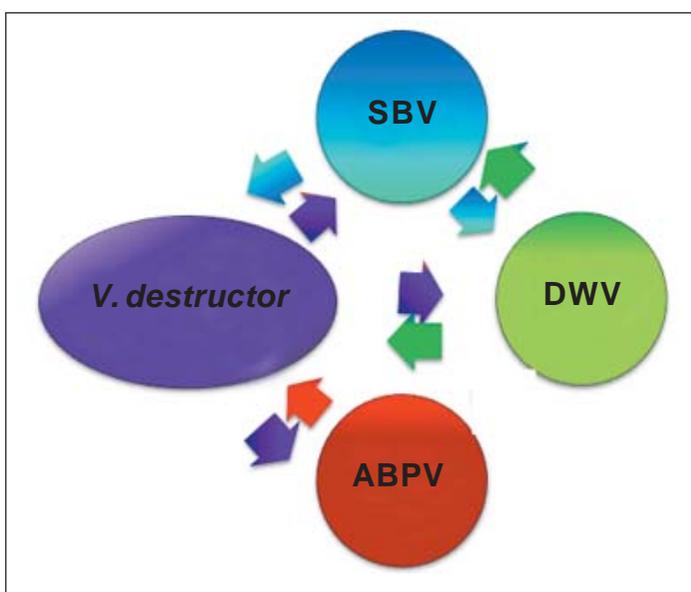
Además, se encontró que el nivel de infestación por *V. destructor* esta positivamente relacionado con la cantidad



**Figura 13.** Prevalencia y nivel de infestación de *V. destructor* en abejas nodrizas en los apiarios 1 y 2 durante los años 2009 y 2010. La flecha roja indica la aplicación de tratamientos acaricidas.

de virus diferentes encontrados (ver Cuadro 1). Esto tiene mayor peso en años con malas condiciones climáticas para la apicultura, como el 2009, donde se observó que el nivel de infestación por *V. destructor* estuvo directamente asociado al nivel de infección por los virus ABPV, DWV y SBV (Figura 14).

Al analizar específicamente el efecto de la presencia de *V. destructor* en las colmenas, se encontró que en colmenas que presentaban el ácaro tenían significativamente mayor nivel de infección por los virus DWV y SBV y menor nivel de infección por *N. ceranae* que aquellas colmenas con ausencia del ácaro (Cuadro 2). Esto se evidenció en el año 2009, mientras que en 2010 estas comparaciones no resultaron significativas.



**Figura 14.** Relación entre el nivel de infección de los diferentes virus y *V. destructor*.

**Cuadro 2.** Efecto de la presencia de *V. destructor* sobre los parámetros analizados. Las colmenas se dividieron en dos grupos de acuerdo a presencia o ausencia del ácaro y los niveles de infección de los otros patógenos estudiados se compararon mediante el Test de Mann Whitney. Se tomaron los dos apiarios y los dos años de forma independiente. Para facilitar la visualización de los resultados, sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$  en rojo).

	APIARIO 1, 2009		APIARIO 1, 2010		APIARIO 2, 2009		APIARIO 2, 2010	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
<b>ABPV</b>	2,11	0,034	-0,14	0,888	1,29	0,195	0,41	0,683
<b>DWV</b>	2,21	0,027	0,71	0,476	5,34	0,000	0,64	0,522
<b>SBV</b>	2,05	0,041	1,78	0,074	3,64	0,000	0,60	0,551
<b><i>N. ceranae</i></b>	-2,93	0,003	1,80	0,071	-3,33	0,001	-0,96	0,336

**Detección de *A. woodi* en abejas pecoreadoras**

Se evaluó la presencia del ácaro *A. woodi* en abejas pecoreadoras. La prevalencia de este ácaro fue muy baja, no encontrándose variaciones estacionales significativas a lo largo del año (Figura 15). No se encontró asociado a la presencia de otros patógenos.

**Detección de *P. larvae* en miel**

Al evaluar la presencia de esporas de *P. larvae* en miel se encontró un bajo número de colmenas infectadas, confirmando que este patógeno no sería un problema en estos dos apiarios (Figura 16). No se encontró asociado a la presencia de otros patógenos.

Al analizar el efecto de la presencia de *P. larvae* se encontró que en las colmenas infectadas, la población de abejas adultas, la cantidad de cría y la producción de miel resultaron significativamente menores que en aquellas

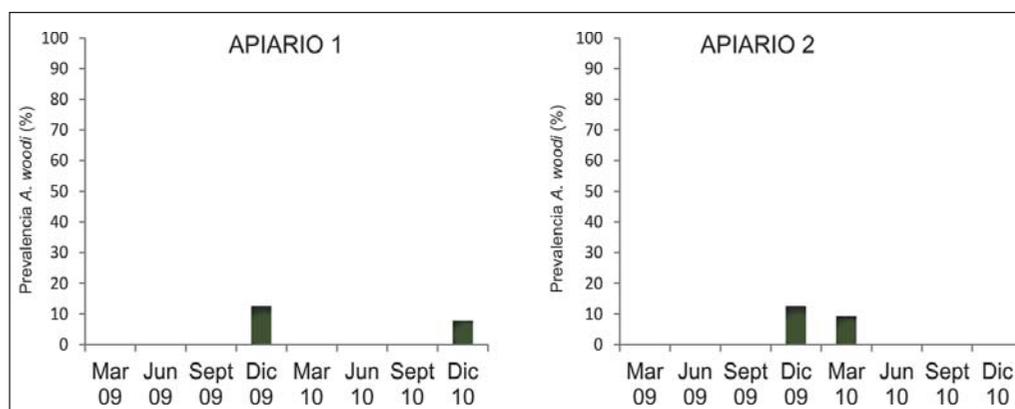
colmenas donde no se encontró la bacteria (Cuadro 3).

**Detección de *Nosema* spp.**

Se determinó la presencia de esporas de *Nosema* spp. en abejas nodrizas y pecoreadoras en las diferentes estaciones durante 2009 y 2010.

Los resultados encontrados al analizar abejas nodrizas y pecoreadoras fueron similares y de acuerdo al Test de Chi-cuadrado, ambos parámetros están asociados ( $\chi^2=7,89$ ;  $p < 0,01$  y  $\chi^2=7,63$ ;  $p < 0,01$  para Ap.1 y 2 respectivamente). Por este motivo sólo se presentan los resultados encontrados en abejas pecoreadoras, de acuerdo a lo recomendado por la OIE (Figura 17).

La especie mayoritaria de *Nosema* spp. presente en Uruguay, y en estos dos apiarios, fue *N. ceranae*. *N. apis* sólo se detectó en una muestra, en una estación del año, en co-infección con *N. ceranae*.



**Figura 15.** Prevalencia de *A. woodi* en abejas pecoreadoras en los apiarios 1 y 2 durante los años 2009 y 2010.

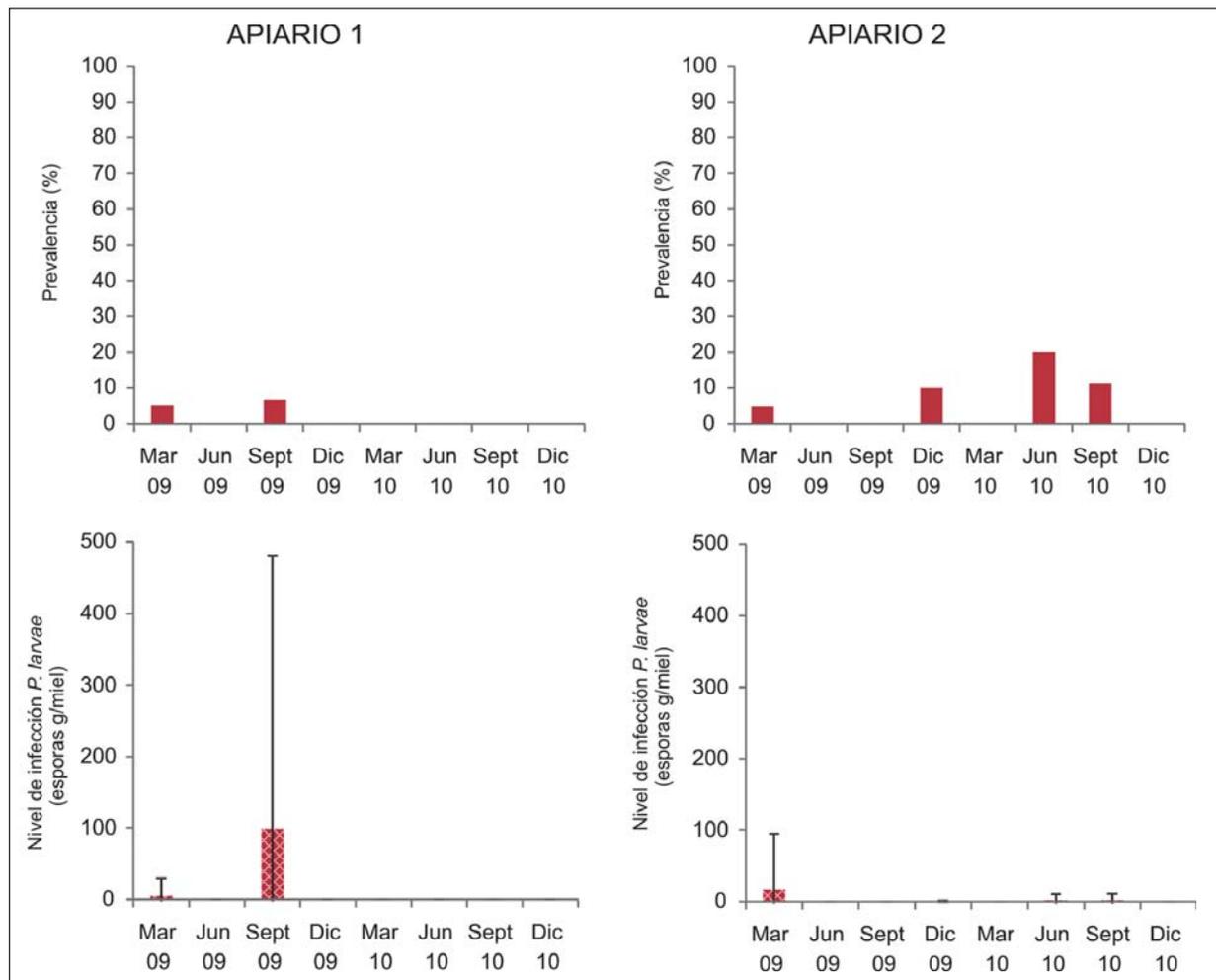


Figura 16. Prevalencia y cuantificación de *P. larvae* en miel en los apiarios 1 y 2 durante los años 2009 y 2010.

Al analizar la variación estacional de *N. ceranae* se pudo observar que el número de colmenas infectadas aumentó en junio, se mantuvo alto durante el invierno y disminuyó hacia el verano. No se encontraron variaciones significativas en el número de esporas a lo largo del año, debido a la alta variabilidad encontrada ( $p \geq 0,05$  en todas las comparaciones).

Posteriormente se compararon las colmenas con presencia y ausencia de *N. ceranae*, y se observó que las colmenas que presentaban esporas tuvieron menos cría, abejas o miel que las colmenas que no las presentaron (Figura 18, Cuadro 4). Cuando se realizaron los análisis de correlaciones, se encontró una asociación negativa entre el número de esporas y la población de abejas, cantidad de cría y producción de miel. Estos resultados sugieren que

**Cuadro 3.** Efecto de la presencia de *P. larvae* sobre los parámetros analizados. Las colmenas se dividieron en dos grupos de acuerdo a presencia o ausencia del patógeno y los niveles de infección de los otros parámetros y patógenos estudiados se compararon mediante el Test de Mann Whitney. Este análisis sólo se realizó en el Apiario 2, año 2010, ya que fue el único punto en donde se encontró un número de muestras infectadas con *P. larvae* suficientes para realizar el análisis ( $n=6$ ). Se calculó el valor exacto de  $p$ , corrección sugerida para  $n$  pequeños. Para facilitar la visualización de los resultados, sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$  en rojo y  $p \leq 0,1$  en azul).

	Apiario 2, 2010		
	N ausencia	N presencia	p exacto
Abejas	70	6	0,000
Cría	71	6	0,060
Miel	71	6	0,043

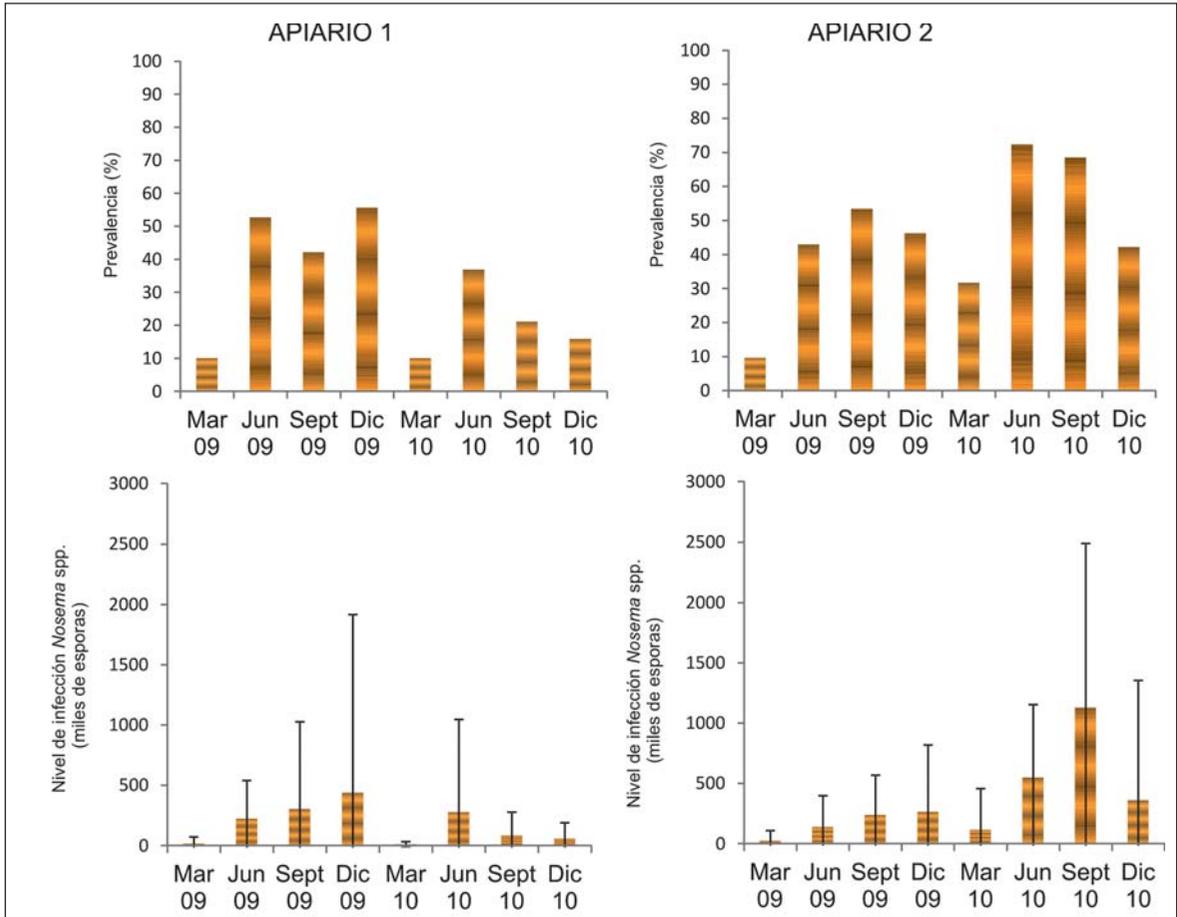


Figura 17. Prevalencia de *N. ceranae* en abejas pecoreadoras en los apiarios 1 y 2 durante los años 2009 y 2010.

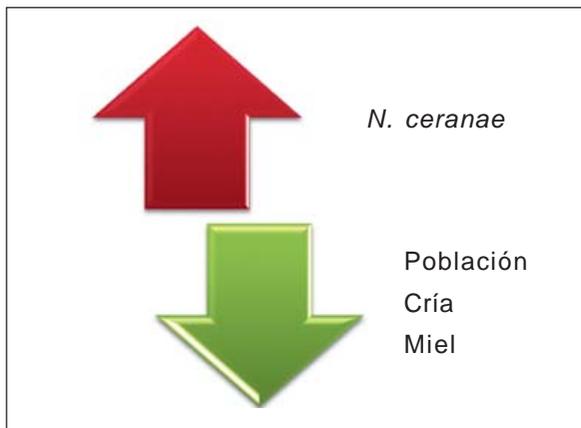


Figura 18. Relación entre el nivel de infección por *N. ceranae* y parámetros productivos.

la presencia y nivel de infección por *N. ceranae* estaría afectando la salud de la colmena (Figura 18, Cuadro 4).

Posteriormente se analizó la relación entre *N. ceranae* y el nivel de infección por los diferentes virus. En

ambos años se encontró que el nivel de infección de este patógeno está inversamente relacionado con la cantidad de virus diferentes encontrados así como con el nivel de infestación por *V. destructor* (ver Cuadro 1).

### Origen botánico del polen

Se determinó el origen botánico del polen recolectado en cada colmena, en cada muestreo. En las figuras 19 y 20 se muestran los resultados obtenidos.

En el año 2009 la mayor diversidad de pólenes se encontró, como era de esperar, en las muestras de marzo y diciembre, constatándose una reducción en las muestras de junio y setiembre. En el año 2010, no se observó una diferencia importante en la diversidad del polen a lo largo del año. Se destaca que durante este año, en ambos apiarios las abejas explotaron una mayor

**Cuadro 4.** Efecto de la presencia de *N. ceranae* sobre los parámetros analizados. Las colmenas se dividieron en dos grupos de acuerdo a presencia o ausencia del microsporidio y los niveles de infección de los otros patógenos estudiados se compararon mediante el Test de Mann Whitney. Se tomaron los dos apiarios y los dos años de forma independiente. Para facilitar la visualización de los resultados, sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$  en rojo).

	APIARIO 1, 2009		APIARIO 1, 2010		APIARIO 2, 2009		APIARIO 2, 2010	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
Abejas	-1,02	0,308	-1,10	0,273	-0,88	0,381	-2,00	0,045
Cría	-1,98	0,047	-0,84	0,404	-2,30	0,022	-0,59	0,554
Miel	-0,07	0,948	-0,93	0,353	0,88	0,381	-2,37	0,018
DWV	-0,66	0,508	-0,67	0,501	-3,19	0,001	-1,09	0,277
SBV	-1,62	0,106	-0,96	0,339	-2,64	0,008	-0,18	0,857
VN	-1,27	0,204	0,02	0,985	-2,60	0,009	-1,17	0,241

diversidad de recursos poliníferos que en el año anterior. El déficit hídrico verificado en el año 2009 pudo afectar la presencia de algunos recursos botánicos, lo que explicaría el resultado encontrado.

No se encontraron correlaciones entre la diversidad de polen y la presencia o nivel de infección de los diferentes patógenos. Sin embargo, si se evidenció en las salidas de campo, que la cantidad de polen en muchos casos era mínima, y esto si podría estar influyendo el estado sanitario de las colmenas.

#### Determinación de plaguicidas en muestras de abejas

Se analizaron muestras de pan de polen de las diferentes colmenas en busca de los siguientes plaguicidas: HCB, Aldrin, Dieldrin, HCH Isómeros, DDT y sus metabolitos, Endrin, Endosulfan, Diazinon, Paratión, Clorpirifos, Etion, Endosulfan sulfato, Cipermetrina, Permetrina, Deltametrina, Fipronil y Fipronil sulfona. No se detectaron residuos de plaguicidas clorados, fosforados, piretroides ni fipronil en ninguna de las muestras.

La no detección de esos residuos no debe tomarse como ausencia de los mismos, dado que en el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el análisis o las condiciones de almacenamiento pueden haber incidido en la degradación, o la concentración podría

ser inferior a los límites del equipo empleado.

#### Condiciones climáticas

La información obtenida de los diferentes parámetros climáticos se correlacionó con los parámetros productivos y el nivel de infección por los diferentes patógenos.

Se encontró que la población de abejas, cría y miel están directamente relacionadas con la temperatura. También se observó que a mayor temperatura y menor presión, mayor nivel de infestación por *V. destructor*, por ABPV, BQCV, DWV y menor nivel de infección por *N. ceranae*.

#### Determinación de la cantidad de proteína corporal de las abejas

Se ha sugerido que existiría una relación directa entre el contenido de proteína corporal de las abejas con su vida media (Orzaez Villanueva *et al.*, 2002). De este modo, el porcentaje de proteína bruta podría constituir un índice de salud (Orzaez Villanueva *et al.*, 2002). Se determinó la cantidad de proteína corporal en abejas nodrizas, pero no se encontraron variaciones significativas en ninguno de los dos apiarios a lo largo del año (Figura 21). Tampoco se encontraron asociaciones con la presencia o nivel de infección de los diferentes patógenos.

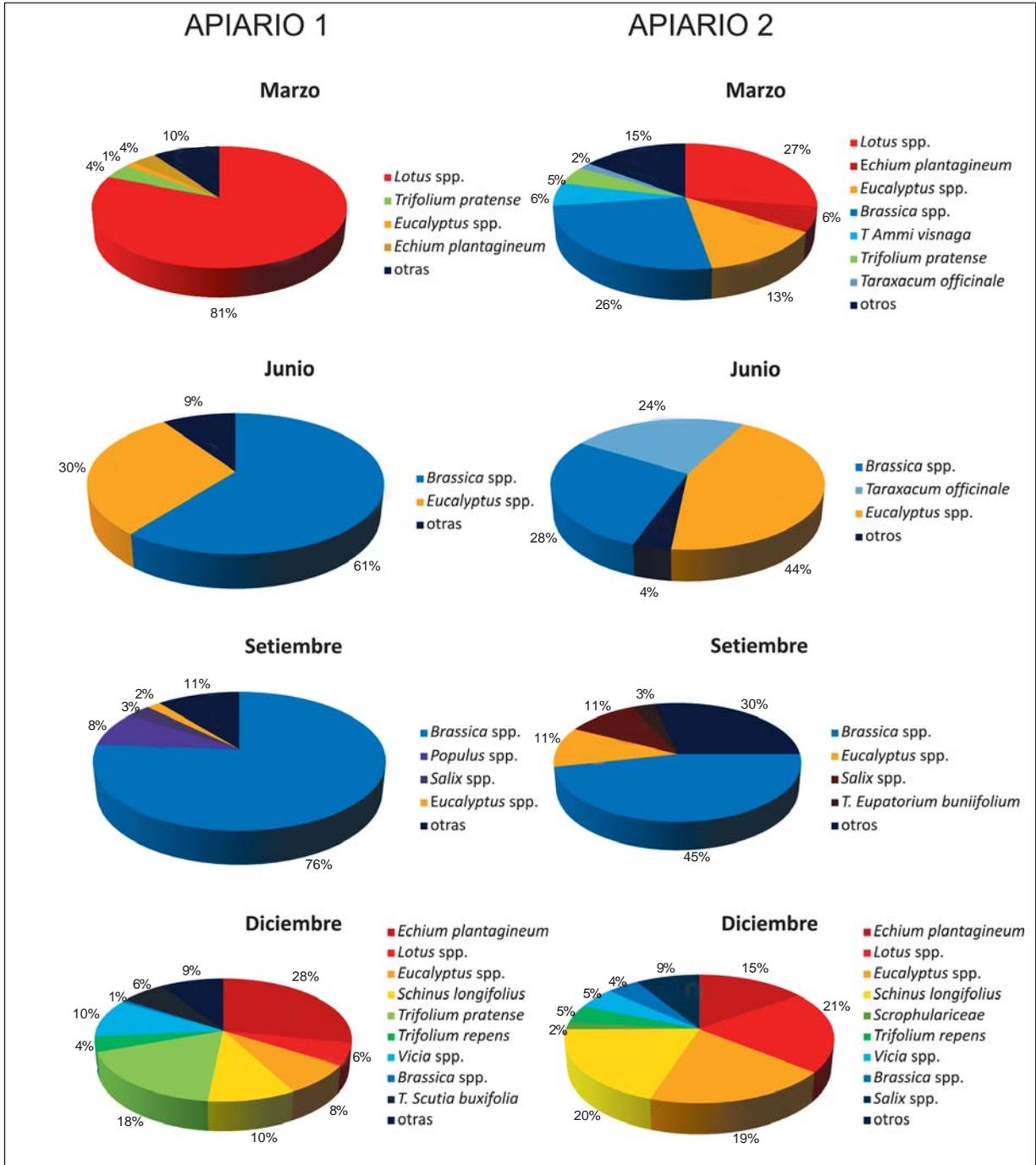


Figura 19. Análisis polínico de las colmenas durante el año 2009. Se presenta el promedio de los valores hallados por colmena. Se muestran los resultados del Apiario 1 y 2.

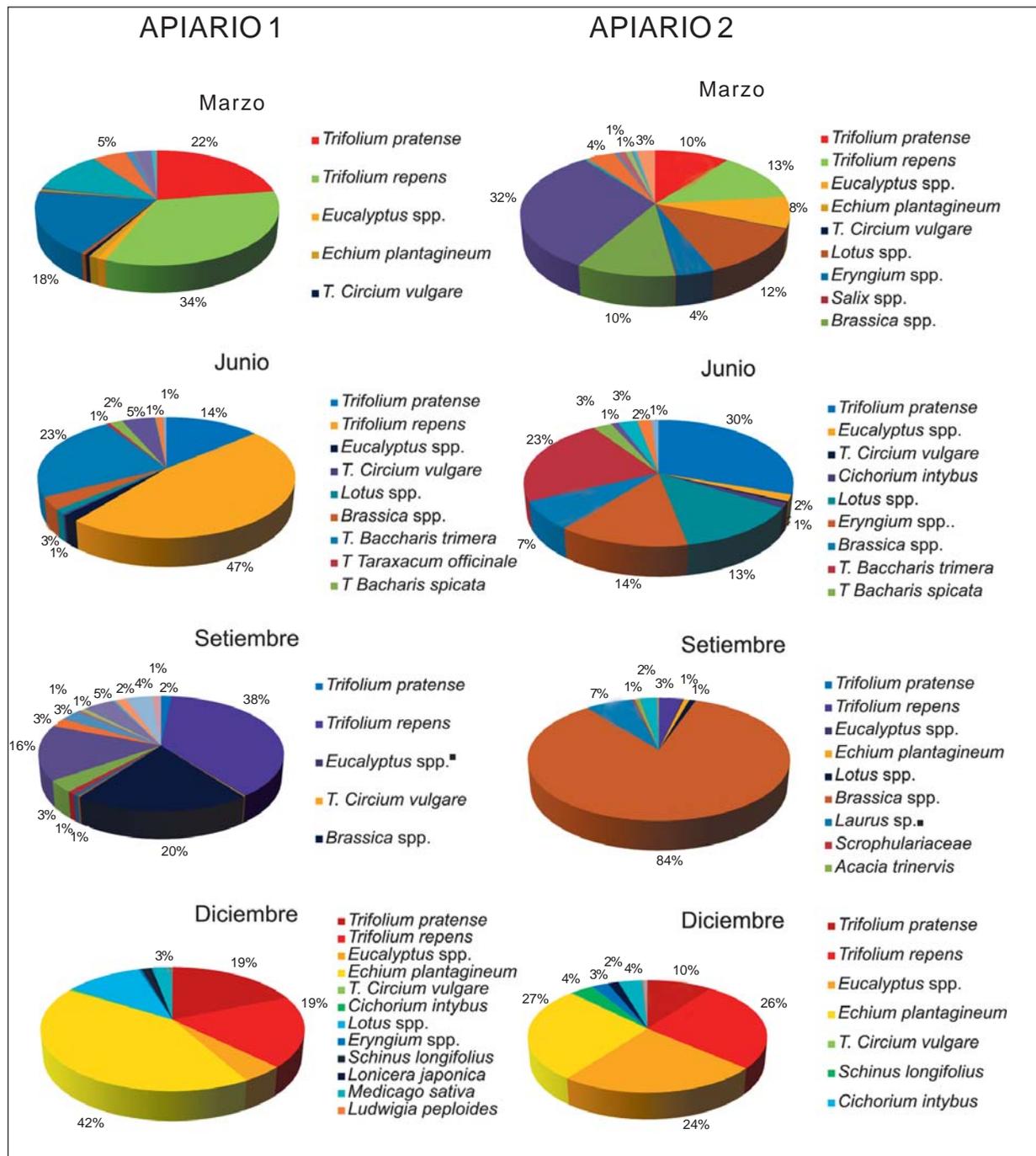


Figura 20. Análisis polínico de las colmenas durante el año 2010. Se presenta el promedio de los valores hallados por colmena. Se muestran los resultados del Apiario 1 y 2.

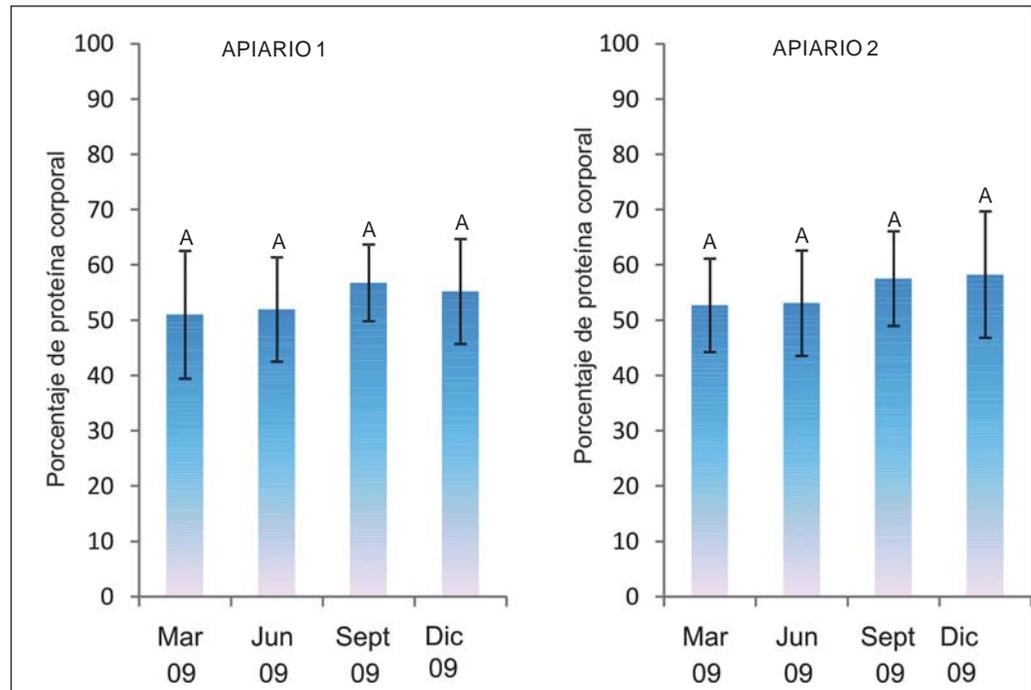


Figura 21. Porcentaje de proteína corporal en muestras de abejas nodrizas durante los años 2009 en los apiarios 1 y 2. Se muestra la media con desvío estándar.

### Análisis de las causas de pérdida de las colmenas

Durante el desarrollo de este estudio se encontraron colonias que se despoblaron completamente durante la invernada (o el periodo otoño-invierno), otras que sufrieron despoblación pero lograron llegar a diciembre aunque con menor población que la inicial, y otras que lograron aumentar su población en primavera, lo que ocurre en el ciclo biológico normal. Para determinar cuáles son los factores que influyen en el debilitamiento de las colmenas se definieron dos indicadores de «despoblación»:

De acuerdo a estas fórmulas, la despoblación máxima (pérdida de la colmena) equivale al valor - 100%.

Posteriormente se analizó en cada apiario cuáles fueron los factores que estuvieron asociados a la despoblación.

En el Apiario 1, en el año 2009, se encontró una clara y significativa relación entre el nivel de infestación por *V. destructor* en marzo y la despoblación anual de colmenas ( $n=20$ ;  $R=-0,644$ ;  $p<0,01$ ). Esta asociación también se encontró al analizar la despoblación invernada aunque con un nivel de significación marginal ( $n=20$ ;  $R=-0,402$ ;

$$\text{Desp.Invernada} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ cuadros con abejas en set.} - \text{N}^\circ \text{ cuadros con abejas en mar.}) \times 100}{\text{N}^\circ \text{ cuadros con abejas en marzo}}$$

$$\text{Desp.Anual} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ cuadros con abejas en dic.} - \text{N}^\circ \text{ cuadros con abejas en mar.}) \times 100}{\text{N}^\circ \text{ cuadros con abejas en marzo}}$$

$p=0,08$ ). Estas asociaciones no pudieron ser corroboradas en el año 2010, ya que las colmenas fueron tratadas con acaricida previo a la toma de las muestras.

La cantidad de esporas de *N. ceranae* también influyó en el estado de la colmena, ya que ese valor en marzo estuvo asociado a la despoblación anual ( $n=20$ ;  $R=-0,492$ ;  $p=0,03$ ). Ese resultado debe ser tomado con precaución, ya que sólo dos de las 20 muestras presentaban esporas, sin embargo, estas dos muestras pertenecieron a las tres que presentaron la tasa de despoblación más alta (-100%). El nivel de infección por este patógeno en setiembre también estuvo asociado a la despoblación anual, aunque en este caso si se detectaron esporas en la mitad de las muestras ( $n=19$ ;  $R=-0,492$ ;  $p=0,03$ , respectivamente).

Durante el año 2010, el patógeno asociado a la despoblación invernal así como anual fue *N. ceranae* en marzo (estimado en abejas nodrizas) ( $n=19$ ;  $R=-0,547$ ;  $p=0,01$  y  $n=19$ ;  $R=-0,396$ ;  $p=0,09$ , respectivamente). Llamativamente, estas asociaciones no resultaron significativas al analizar abejas pecoreadoras. Por otro lado, el nivel de infección por BQCV en marzo también estuvo marginalmente asociado a la despoblación invernal ( $n=18$ ;  $R=-0,426$ ;  $p=0,08$ ). Es importante recalcar que en esta ocasión no se pudo estimar el papel de *V. destructor* porque las muestras fueron tratadas con acaricidas previo a la toma de muestras.

Por otro lado, en el Apiario 2 en el año 2009 el único factor que estuvo marginalmente asociado a la despoblación invernal, fue la cantidad de pólenes diferentes en junio, a mayor diversidad de polen, menor despoblación ( $n=5$ ;  $R=0,866$ ;  $p=0,06$ ). Esta asociación se debe tomar con precaución ya que el número de colonias analizadas fue bajo.

En el año 2010 el nivel de infección por *N. ceranae* en marzo y en diciembre estuvo asociado a la despoblación anual ( $n=20$ ;  $R=-0,481$ ;  $p=0,04$  y  $n=18$ ;  $R=-0,690$ ;  $p<0,01$ ).

El nivel de infección por BQCV en marzo y en setiembre también estuvo significativamente asociado con la despoblación invernal ( $n=18$ ;  $R=-0,478$ ;  $p=0,04$  y  $n=18$ ;  $R=-0,791$ ;  $p<0,01$ , respectivamente).

## CONCLUSIONES

- La principal causa de muerte de las colmenas pertenecientes a los apiarios bajo seguimiento fue el intento de cambio de reina. En algunos casos puntuales se observaron síntomas de hambre, o la presencia de picapalos, siendo muy pocos los casos que no presentaron causas evidentes. Esto denota la importancia del buen manejo de parte del apicultor y del seguimiento de las colmenas. Como perspectiva de este trabajo, es sumamente importante profundizar en el estudio de las causas de la aparición de colmenas zanganeras.
- Las condiciones climáticas extremas, además de afectar severamente la productividad de las colmenas por su incidencia en las floraciones, influyen significativamente en el estado sanitario de las mismas. En estos años, es mayor el impacto que tienen los diferentes patógenos en la salud y productividad de la colmena.
- En cuanto a la despoblación invernal o anual de las colmenas, se encontró que los factores asociados a estas pérdidas variaron de acuerdo al año y a la región geográfica. A pesar de esto, se pudo establecer una asociación entre la presencia de diferentes patógenos, principalmente *V. destructor* y *N. ceranae* y la despoblación.
- La presencia y el nivel de infestación del ácaro *V. destructor* está asociado a la presencia y carga viral de diferentes virus, especialmente el virus de alas deformadas y el virus de la cría ensacada. A la vez, la presencia de uno de estos virus facilita la infección por otros virus, debilitando aún más las colmenas. Esto se evidencia espe-

cialmente en años con condiciones climáticas desfavorables.

- *N. ceranae* puede afectar la población de abejas adultas, la cantidad de cría y la producción de miel.
- En estos apiarios no se evidenció presencia de insecticidas sistémicos. Sin embargo, esto no se puede descartar como un problema en otros apiarios del país.
- La vigilancia epidemiológica frente otros patógenos que no tuvieron un rol importante en la sanidad de estas colmenas (*P. larvae*, *N. apis*, *A. woodi*), o que incluso no se han detectado en nuestro país (*Tropilaelaps* spp.), no debe ser descuidada, de forma de evitar el ingreso de los mismos (o variantes más virulentas) que puedan tener consecuencias nocivas para la apicultura uruguaya.

## AGRADECIMIENTOS

Al INIA por la financiación del presente proyecto.

A los apicultores que donaron sus colmenas y colaboraron en el desarrollo del proyecto.

A Estela Santos por su colaboración en el análisis de las muestras de polen.

A Helena Katz y Gabriela Gardiol por los análisis de *Nosema* spp.

A Diego Venturini, por la fotografía de portada.

## BIBLIOGRAFÍA

ALAUX, C.; BRUNET, J. L.; DUSSAUBAT, C.; MONDET, F.; TCHAMITCHAN, S.; COUSIN, M.; BRILLARD, J.; BALDY, A.; BELZUNCES, L. P.; LE CONTE, Y. 2010a. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774-782.

ALAUX, C.; DANTEC, C.; PARRINELLO, H.; LE CONTE, Y. 2011. Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on

healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics.* 12, 496.

ALAUX, C.; DUCLOZ, F.; CRAUSER, D.; LE CONTE, Y. 2010b. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters.* doi: 10.1098/rsbl.2009.0986.

ANTUNEZ, K.; D'ALESSANDRO, B.; CORBELLA, E.; ZUNINO, P. 2005. Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* 90, 69-72.

ANTUNEZ, K.; D'ALESSANDRO, B.; CORBELLA, E.; RAMALLO, G.; ZUNINO, P. 2006. Honeybee viruses in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* 93, 67-70.

ANTUNEZ, K.; D'ALESSANDRO, B.; PICCINI, C.; CORBELLA, E.; ZUNINO, P. 2004. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *J. Invertebr. Pathol.* 86 (1-2), 56-58.

AURORI, C. M.; DEZMIREAN, D. S.; MARGHITAS, L. A.; MORITZ, R. F. 2011. *Nosema apis* and *N. ceranae* in Western Honeybee (*Apis mellifera*) – Geographical Distribution and Current Methods of Diagnosis. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies.* 68, 63-70.

BEKESI, L.; BALL, B. V.; DOBOS-KOVACS, M.; BAKONYI, T.; RUSVAI, M. 1999. Occurrence of acute paralysis virus of the honey bee (*Apis mellifera*) in a Hungarian apiary infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Acta Vet. Hung.* 47, 319-324.

BELZUNCES, L. P.; TCHAMITCHIAN, S.; BRUNET, J. L. 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie.* 43, 348 - 370.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P. L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D. M.; MARTINSON, V.; VANENGELSDORP, D.; KALKSTEIN, A. L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S. K.; SIMONS, J. F.; EGHOLM, M.; PETTIS, J. S.; LIPKIN, W. I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science.* 318, 283-287.

- CHANTAWANNAKUL, P.; WARD, L.; BOONHAM, N.; BROWN, M.** 2006. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in Varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 69-73.
- CHEN, Y.; EVANS, J. D.; SMITH, I. B.; PETTIS, J. S.** 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 186-188.
- CHEN, Y.; SIEDE, R.** 2007. Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research.* 70, 33-80.
- DAINAT, B.; EVANS, J. D.; CHEN, Y. P.; GAUTHIER, L.; NEUMANN, P.** 2012. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One* 7. e32151.
- DEMIRANDA, J. R.; CORDONI, G.; BUDGE, G.** 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl 1, S30-47.
- DIGEGRÁ.** 2010. Registro Apícola. Dirección General de la Granja (DIGEGRÁ), MGAP.
- EL HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GARY, V.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C.** 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 653-661.
- EL HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C.** 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 30-39.
- ELLIS, J.; EVANS, J.; VANS, J.; PETTIS, J.** 2010. Colony losses, managed colony population decline and Colony Collapse Disorder in the United States. *J. Apicul. Res.* 49, 134-136.
- ERDTMAN, G.** 1952. Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms. Wiskell., S.A.a., ed., p. 539 pp.
- GAMERRO, J. C.; CÁRDENAS, O.** 1980. Como hacer permanentes las preparaciones palinológicas en glicerol- gelatina. *Bol. Asoc. Latinoameric. Paleob. Palinol.* 7, 39-42.
- GENERSCH, E.; AUBERT, M.** 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet. Res.* 41, 54.
- HARRIET, J.; CAMPÁ, J.** 2012. «Productividad de miel por colmena». *Actualidad Apícola. Revista de la Sociedad Apícola del Uruguay.* 94, 12-15.
- HIGES, M.; GARCIA-PALENCIA, P.; MARTIN-HERNANDEZ, R.; MEANA, A.** 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211-217.
- HIGES, M., MARTIN-HERNANDEZ, R.; BOTIAS, C.; BAILON, E. G.; GONZALEZ-PORTO, A. V.; BARRIOS, L.; DEL NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; JIMENEZ, J. J.; PALENCIA, P. G.; MEANA, A.** 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10, 2659-2669.
- HIGES, M.; MARTIN, R., MEANA, A.** 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 93-95.
- INVERNIZZI, C.; ABUD, C.; TOMASCO, I. H.; HARRIET, J.; RAMALLO, G.; CAMPA, J.; KATZ, H.; GARDIOL, G., MENDOZA, Y.** 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 150-153.
- INVERNIZZI, C.; ANTÚNEZ, K.; CAMPA, J. P.; HARRIET, J.; MENDOZA, Y.; SANTOS, E.; ZUNINO, P.** 2011. Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. *Veterinaria.* 47 (181), 15-27.
- MAORI, E.; PALDI, N.; SHAFIR, S.; KALEV, H.; TSUR, E.; GLICK, E.; SELA, I.** 2009. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol. Biol.* 18, 55-60.
- MARTIN-HERNANDEZ, R.; MEANA, A.; PRIETO, L.; SALVADOR, A. M.; GARRIDO-BAILON, E.; HIGES, M.** 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6331-6338.
- MENDOZA, Y.** 2012. Resistencia de las abejas melíferas frente al microsporidio *Nosema ceranae* en forestaciones de Eucalyptus grandis. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, UdelaR. Uruguay.

- MOREIRA, R.; CANCINO, P.** 2005. Investigación epidemiológica de un caso de alta mortalidad de abejas en apiarios de la comuna de Casablanca, V Región. Boletín Veterinario Oficial. Salud Animal e Inocuidad de los Alimentos. 2.
- MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W.** 2000. The value of honey bee pollination the United States. *Bee Culture*. 128, 1-15.
- NEUMANN, P.; CARRECK, N.** 2010. Honey bee colony losses. *J. Apicul. Res.* 49, 1-6.
- OIE.** 2004a. Nosemosis of bees. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004. [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A\\_00123.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00123.htm).
- OIE.** 2004b. Varroosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004. [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A\\_00124.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00124.htm).
- OIE.** 2008. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2008.
- ORZAEZ VILLANUEVA, M. T.; DE FRUTOS PRIETO, A.; TELLEZ GONZALEZ, M.; BLAZQUEZ ABELLAN, G.** 2002. Consumption habits of apiary products in an elder collective. *Arch Latinoam. Nutr.* 52, 362-367.
- PAREJA, L.; COLAZZO, M.; PEREZ-PARADA, A.; NIELL, S.; CARRASCO-LETELIER, L.; BESIL, N.; CESIO, M. V.; HEINZEN, H.** 2011. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 8, 3844-3858.
- PICCINI, C.; ZUNINO, P.** 2001. American Foulbrood in Uruguay: Isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from Larvae with Clinical Symptoms and Adult Honeybees and Susceptibility to Oxytetracycline. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 176-177.
- POTTS, S. G.; ROBERTS, S. P.; DEAN, R., MARRIS, G.; BROWN, M. A.; JONES, R.; NEUMANN, P.; SETTELE, J.** 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apicul. Res.* 49, 15-22.
- REYNALDI, F. J.; SGUAZZA, G. H.; PECORARO, M. R.; TIZZANO, M. A.; GALOSI, C.M.** 2010. First report of viral infections that affect argentine honeybees. *Env. Microbiol. Reports.* 2, 749-751.
- RODRIGUEZ, M.; VARGAS, M.; GERDING, M.; NAVARRO, H.; ANTÚNEZ, K.** 2012. Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *J. Apicul. Res.* In press.
- SANTOS, E.** 2010. Presencia de alcaloides pirrolizidínicos en mieles uruguayas. Congreso Nacional de Apicultura, Uruguay, 2010.
- SHEN, M.; CUI, L.; OSTIGUY, N.; COX-FOSTER, D.** 2005a. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.* 86, 2281-2289.
- SHEN, M.; YANG, X.; COX-FOSTER, D.; CUI, L.** 2005b. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology.* 342, 141-149.
- SHIMANUKI, H.; KNOX, D. A.** 1997. Bee health and international trade. *OIE Revue Scientifique et Technique.* 16, 172-176.
- SIMÓ, E.** 2002. Las abejas de miel y la polinización. *Método33.*
- STOKSTAD, E.** 2007. The case of the empty hives. *Science.* 316, 970 - 972.
- TEIXEIRA, E. W.; CHEN, Y.; MESSAGE, D.; PETTIS, J.; EVANS, J. D.** 2008. Virus infections in Brazilian honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 117-119.
- TINGLE, C. C.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J.** 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 176, 1 - 66.
- VAN ENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S.** 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*4. e6481.
- VAN ENGELSDORP, D.; HAYES, J. JR.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J.** 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One*3. e4071.
- VAN ENGELSDORP, D.; HAYES, J.; UNDERWOOD, R. M., PETTIS, J. S.** 2010a. A survey of honey bee colony losses in United States, fall 2008 to spring 2009. *J. Apicul. Res.* 49, 7-14.

- VAN ENGELSDORP, D.; SPEYBROECK, N.; EVANS, J. D.; NGUYEN, B. K.; MULLIN, C.; FRAZIER, R.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; TARPY, D. R.; HAUBRUGE, E.; PETTIS, J. S.; SAEGERMAN, C.** 2010b. Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. *J. Econ. Entomol.* 103, 1517-1523.
- VANDAME, R.; PALACIO, M. A.** 2010. Honey bee preserved health in Latin America: a fragile equilibrium. *Apidologie.* 41, 243 - 255.
- VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUES, B.; BRUNET, J. L.; TEXIER, C.; BIRON, D. G.; BLOT, N.; EL ALAOU, H.; BELZUNCES, L. P.; DELBAC, F.** 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6. e21550.
- VILLALBA, V.** 2011. «Situación de la acariosis (*Acarapis woodie* R.) en apiarios de zonas con antecedentes de la enfermedad». Trabajo de Tesis. Facultad de Veterinaria. UdelaR.
- YANG, X.; COX-FOSTER, D.** 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology.* 134, 405-412.
- YUE, C.; GENERSCH, E.** 2005. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 86, 3419-3424.

